

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORLED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 37 481 A 1**

⑤① Int. Cl.⁶:
C 08 J 3/14
C 08 L 5/00
C 12 P 19/04
A 61 K 9/16
A 23 L 1/03
C 08 B 37/00

⑳ Aktenzeichen: 197 37 481.6
㉔ Anmeldetag: 28. 8. 97
㉕ Offenlegungstag: 4. 3. 99

DE 197 37 481 A 1

㉑ Anmelder:
Hoechst AG, 65929 Frankfurt, DE

㉒ Vertreter:
Luderschmidt, Schüler & Partner GbR, 65189
Wiesbaden

㉓ Erfinder:
Bengs, Holger, Dr., 60598 Frankfurt, DE; Grande,
Jürgen, 65812 Bad Soden, DE; Schneller, Arnold,
Dr., 64409 Messel, DE; Böhm, Gitta, 60439
Frankfurt, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

㉔ Sphärische lineare Polysaccharide enthaltende Mikropartikel

㉕ Es werden Mikropartikel mit gleichmäßiger sphärischer Gestalt beschrieben, die eine sehr enge Größenverteilung aufweisen. Sie bestehen ganz oder teilweise aus einem linearen wasserunlöslichen Polysaccharid, vorzugsweise aus 1,4- α -D-Polyglucosan und können weitere insbesondere biologisch abbaubare Polymere und/oder Wirkstoffe enthalten. Sie sind u. a. für die kontrollierte Abgabe von Wirkstoffen geeignet. Sie werden hergestellt durch Auflösen von 1,4- α -D-Polyglucosan oder des Polysaccharids in einem Lösungsmittel, Einbringen der Lösung in ein Fällmittel, Kühlen des Gemisches und Abtrennen der gebildeten Partikel.

wo 99/11695
5-26-99

DE 197 37 481 A 1

Die Erfindung betrifft sphärische Mikropartikel, welche lineare Polysaccharide enthalten, Verfahren zu deren Herstellung sowie deren Verwendung, insbesondere bei der kontrollierten Abgabe von Wirkstoffen.

- 5 Verfahren zur Herstellung von Partikeln, insbesondere Mikropartikeln aus Polymeren, wie z. B. Polysacchariden, für verschiedenste Anwendungen sind recht komplizierte Verfahren, die eine genaue Einhaltung unterschiedlicher Parameter voraussetzen. Insbesondere führen viele Verfahren auch nur zu geringen Ausbeuten und zu sehr breiten Partikelverteilungen. Zu nennen in diesem Zusammenhang sind vor allem Sprühtrocknung, Phasengrenzflächenkondensation und Emulsionsverfahren (z. B. WO-Verfahren = Wasser in Öl Emulsionen, WOW = Wasser in Öl in Wasser Emulsionen, 10 Koazervation, Phasenseparation, Dispersion). Insbesondere Emulsionsverfahren, aber auch Sprühtrocknungen aus Zweiphasensystemen, erfordern ein sehr exaktes Vorgehen und in der überwiegenden Zahl der Fälle die Verwendung von Hilfsmitteln (Emulgatoren). Stabile Emulsionen sind oftmals nur mit hohem Aufwand und einer präzisen Kontrolle einer Vielzahl von Parametern (Temperatur, Rührgeschwindigkeit usw.) herzustellen, und die umfassende Abtrennung der Partikel bereitet Probleme. Die Ausbeute an Partikeln ist oft sehr niedrig, insbesondere ist die Einschlußrate von Wirksubstanzen ungenügend. Ein Aspekt, der im Fall teurer Pharmawirkstoffe die Anwendung einer Technologie verhindern kann.

- Kugelförmige Mikropartikel, die neben Weinsäure enthaltenden Polykondensaten auch Ethylstärke oder sonstige Polysaccharide enthalten können, werden gemäß US-PS 5 391 696 einmal nach dem Verfahren der Sprühtrocknung erhalten, mit dem jedoch die Teilchengröße und besonders die Größenverteilung nur sehr schwer zu regeln ist. Eine weitere 20 dieser Patentschrift beschriebene Möglichkeit ist das Auflösen des Polymers in einem Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch und das Eintropfenlassen der Lösung in ein kaltes verflüssigtes Gas, z. B. flüssigen Stickstoff, wobei sich kugelförmige Partikel bilden. Die Kügelchen können dann in Wasser eingebracht werden, das gleichzeitig das Polymer ausfällt und das Lösungsmittel extrahiert. Dieses Verfahren ist umständlich, aufwendig und unökonomisch. Auch läßt die Gleichmäßigkeit der Partikeldimensionen zu wünschen übrig.

- 25 Die EP-B1-0 251 476 beschreibt die Herstellung von Mikropartikeln aus Polylactiden, in denen ein makromolekulares Polypeptid dispergiert ist. Auch hier ist eine intensive Kontrolle der verschiedensten Parameter erforderlich. Einheitliche sphärische Teilchen werden nicht erhalten.

Mikropartikel, welche Wirkstoffe und Gase enthalten, werden in der WO 95/07 072 beschrieben. Die Herstellung erfolgt nach aufwendigen Emulsionsverfahren, die Größenverteilung der Partikel ist sehr uneinheitlich.

- 30 Yu Jiugao und Liu Jie berichten in starch/stärke 46(7)252-5(1994) über die Effekte der Suspensions-Vernetzungs-Reaktionsbedingungen auf die Größe von Stärke-Mikrokugeln. Die Vernetzung findet in drei Stufen statt; das Medium ist eine Wasser-in-Öl Suspension, als Öl-Phase dient ein Erdnußöl/Toluol Gemisch. Vorgelatinisierte Stärke wird als wäßrige Lösung, die noch Natriumhydroxid und Ethylendiamintetraessigsäure enthält, zugegeben. Ferner ist die Gegenwart eines oberflächenaktiven Mittels bzw. Stabilisators erforderlich.

- 35 Von Nachteil bei dem dort beschriebenen Verfahren ist, daß das Ergebnis von einer Vielzahl von Faktoren abhängig ist, nämlich von der Dichte, der Viskosität und den Konzentrationsverhältnissen sowohl der wäßrigen als auch der Öl-Phase, vom Stabilisator und von der Rührgeschwindigkeit, außerdem ist die Anwesenheit des Stabilisators nachteilig. Zudem ist es schwierig die Vielzahl der gegebenen Parameter zu kontrollieren, so daß die Reproduzierbarkeit nicht zufriedenstellend ist.

- 40 Mit makromolekularen Wirkstoffen beladene Teilchen aus wasserunlöslichen Polymeren wie Polymilchsäure oder Ethylcellulose werden entsprechend der Lehre der EP-B1-0 204 476 erhalten, indem man den partikulären Wirkstoff in einer acetonischen Lösung des Polymeren suspendiert und das Lösungsmittel bei Raumtemperatur abdampft. Die dabei entstehenden Teilchen zeigen noch nicht die gewünschten pharmakologischen Effekte, so daß eine Weiterverarbeitung zu sogenannten Pellets notwendig ist.

- 45 Obwohl bereits Mikropartikel mit sphärischer Gestalt sowie Verfahren zu deren Herstellung bekannt sind, besteht noch ein Bedürfnis nach derartigen Mikropartikeln mit verbesserten Eigenschaften sowie nach vorteilhafteren, insbesondere ökonomischen und leicht reproduzierbaren Herstellungsverfahren. Aufgabe der Erfindung ist es deshalb, Mikropartikel zur Verfügung zu stellen, die eine weitgehend regelmäßige sphärische Gestalt besitzen, die ferner eine möglichst enge Größenverteilung, d. h. eine große Einheitlichkeit aufweisen und die sich vielseitig verwenden lassen. Aufgabe der 50 Erfindung ist weiter, ein Verfahren zur Herstellung derartiger Mikropartikel zur Verfügung zu stellen, das einfach und wirtschaftlich durchzuführen ist, das Mikropartikel mit regelmäßigen Strukturen und großer Einheitlichkeit liefert, die gute mechanische Eigenschaften besitzen, die biologisch abbaubar sind, die mit verschiedensten Wirkstoffen versehen werden können und die besonders geeignet sind für die kontrollierte Abgabe von Wirkstoffen.

- Diese Aufgabe wird gelöst durch sphärische Mikropartikel mit einem mittleren Durchmesser von 1 nm bis 100 µm, bestehend ganz oder teilweise aus mindestens einem wasserunlöslichen, linearen Polysaccharid.

- "Lineare, wasserunlösliche Polysaccharide" im Sinne der vorliegenden Erfindung sind Polysaccharide, die aus Monosacchariden, Disacchariden oder anderen monomeren Bausteinen derart aufgebaut sind, daß die Monosaccharide, Disaccharide oder anderen monomeren Bausteine stets in der gleichen Art miteinander verknüpft sind. Jede so definierte Grundeinheit oder Baustein hat genau zwei Verknüpfungen, jeweils eine zu einem anderen Monomer. Davon ausgenommen sind die beiden Grundeinheiten, die den Anfang und das Ende des Polysaccharids bilden. Diese Grundeinheiten haben nur eine Verknüpfung zu einem weiteren Monomer. Bei drei Verknüpfungen (kovalente Bindungen) spricht man von einer Verzweigung. Lineare, wasserunlösliche Polysaccharide im Sinne der Erfindung weisen keine Verzweigungen oder 60 allenfalls nur in untergeordnetem Maß auf, so daß sie bei sehr kleinen Verzweigungsanteilen den herkömmlichen analytischen Methoden nicht zugänglich sind.

- 65 Im Rahmen der Erfindung werden bevorzugt lineare, wasserunlösliche Polysaccharide, welche in einem biotechnischen, insbesondere in einem biokatalytischen, auch biotransformatorischen, oder einem fermentativen Prozeß hergestellt wurden.

Lineare Polysaccharide hergestellt durch Biokatalyse (auch: Biotransformation) im Rahmen dieser Erfindung bedeu-

tet, daß das lineare Polysaccharid durch katalytische Reaktion von monomeren Grundbausteinen wie oligomeren Sacchariden, z. B. von Mono- und/oder Disacchariden, hergestellt wird, indem ein sogenannter Biokatalysator, üblicherweise ein Enzym, unter geeigneten Bedingungen verwendet wird.

Lineare Polysaccharide aus Fermentationen sind im Sprachgebrauch der Erfindung lineare Polysaccharide, die durch fermentative Prozesse unter der Verwendung in der Natur vorkommende Organismen, wie Pilzen, Algen oder Bakterien oder unter der Verwendung von in der Natur nicht vorkommender Organismen, aber unter Zuhilfenahme von gentechnischen Methoden allgemeiner Definition modifizierten natürlichen Organismen, wie Pilzen, Algen oder Bakterien gewonnen werden oder unter Einschaltung und Mithilfe von fermentativen Prozessen gewonnen werden können.

Lineare Polymere gemäß der vorliegenden Erfindung können neben dem bevorzugten 1,4- α -D-Polyglucan auch weitere Polyglucane oder andere lineare Polysaccharide wie etwa Pullulane, Pektine, Mannane oder Polyfructane sein.

Darüber hinaus können lineare Polymere zur Herstellung der in der vorliegenden Erfindung beschriebenen Mikropartikel auch aus der Reaktion weiterer nicht-linearer Polysaccharide dadurch gewonnen werden, daß nichtlineare Polysaccharide, die Verzweigungen enthalten, derart mit einem Enzym behandelt werden, daß es zur Spaltung der Verzweigungen kommt, so daß nach ihrer Abtrennung lineare Polysaccharide vorliegen. Bei diesen Enzymen kann es sich beispielsweise um Amylasen, iso-Amylasen, Glucohydrolasen oder Pullulanasen handeln.

In einer besonders vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung bestehen die sphärischen Mikropartikel ganz oder teilweise aus 1,4- α -D-Polyglucan. Bevorzugt wurde das 1,4- α -D-Polyglucan mittels eines biokatalytischen (biotransformatorischen) Prozesses mit Hilfe von Polysaccharidsynthasen oder Stärkesynthasen oder Glykosyltransferasen oder α -1,4-Glucantransferasen oder Glycogensynthasen oder Amylosucrasen oder Phosphorylasen hergestellt. Die Molekulargewichte M_w der erfindungsgemäß verwendeten linearen Polysaccharide können in einem weiten Bereich von 10^3 g/mol bis 10^7 g/mol variieren. Für das vorzugsweise verwendete lineare Polysaccharid 1,4- α -D-Polyglucan werden vorzugsweise Molekulargewichte M_w im Bereich von 10^4 g/mol bis 10^5 g/mol, insbesondere 2×10^4 g/mol bis 5×10^4 g/mol verwendet.

Es wurde nun überraschend festgestellt, daß durch ein sehr einfaches Verfahren sehr einheitliche Mikropartikel aus wasserunlöslichen linearen Polysacchariden in großen Mengen hergestellt werden können, die so mit ähnlichen kommerziell erhältlichen Polysacchariden, wie etwa Amylose oder Stärke, nicht erhalten werden.

Gegenstand der Erfindung ist daher ferner ein Verfahren zur Herstellung von sphärischen Mikropartikeln, welche ganz oder teilweise aus wasserunlöslichen, linearen Polysacchariden, insbesondere 1,4- α -D-Polyglucan bestehen durch Lösen des wasserunlöslichen, linearen Polysaccharids oder des 1,4- α -D-Polyglucan in einem Lösungsmittel, Einbringen der Lösung in ein Fällmittel, Kühlen des dabei entstehenden Gemisches und Abtrennen der gebildeten Mikropartikel. In den Ansprüchen 20 bis 23 werden besonders vorteilhafte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens angegeben.

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform wurden die linearen, wasserunlöslichen Polysaccharide durch enzymatische Behandlung von verzweigten oder hochverzweigten Polysacchariden hergestellt.

Dimethylsulfoxid ist bevorzugtes Lösungsmittel für die Auflösung der linearen Polysaccharide; weitere Lösungsmittel können u. a. sein: Formamid, Acetamid, N,N-Dimethylformamid, N,N-Dimethylacetamid, N-Methylmorpholin-N-oxid in Gegenwart von Wasser sowie weitere N-substituierte Morpholin-N-oxide, wäßrige Lösung mit hohem oder niedrigem pH-Wert.

Als Fällungsmittel ist Wasser bevorzugt; der Prozeß kann durch die Verwendung anderer Lösungsmittel die Wasser ganz oder teilweise ersetzen können, z. B. Dichlormethan beeinflusst werden, wobei u. a. die Dauer des Fällprozesses und die Struktur der Oberfläche der Partikel gesteuert werden können.

Auch Gemische von Wasser mit Alkoholen, z. B. Methanol, Ethanol, Isopropanol, sind dazu geeignet, die Prozeßparameter, sowie die Eigenschaften der Partikel zu beeinflussen.

Die Temperatur während des Fällprozesses liegt im allgemeinen vorzugsweise im Bereich von 0°C bis -10°C , es können jedoch auch höhere oder tiefere Temperaturen genommen werden.

Der Fällprozeß kann relativ langsam bei tiefer Temperatur über Nacht durchgeführt werden oder durch Variation des Fällungsmittels und der Temperatur beeinflusst werden.

Durch Mitverwendung geeigneter Zusatzstoffe läßt sich Einfluß nehmen auf die Eigenschaften der Partikel wie die Größe, die Struktur der Oberfläche usw. sowie auf die Prozeßführung. Geeignete Zusatzstoffe sind beispielsweise oberflächenaktive Stoffe wie Natriumdodecylsulfat, oder N-Methylgluconamid, Zucker, z. B. Fructose, Saccharose, Glucose.

Die oberflächenaktiven Substanzen können anionischer, kationischer oder nichtionischer Natur sein.

Generelle Beispiele oberflächenaktiver Substanzen sind:

Polysorbate (z. B. Tween®), Alkylpolyglycolether, Ethylenoxid-Propylenoxid-Blockpolymere (z. B. Pluronic®), Alkylpolyglycolthersulfate, Alkylsulfate (z. B. das bereits erwähnte Natriumdodecylsulfat), Fettsäureglycolester. Die Zusatzstoffe werden bevorzugt dem Fällungsmittel zugefügt.

Die Konzentration des linearen Polysaccharids in der Lösung kann in weiten Grenzen variiert werden, sie beträgt vorzugsweise 0,1 g Polysaccharid pro 1 ml Lösungsmittel.

Andere Bereiche wie 0,05 g/ml bis 0,2 g/ml oder 0,02 g/ml bis 0,5 g/ml sind möglich.

Die erfindungsgemäßen Partikel können aus mindestens einem linearen Polysaccharid bestehen und können mindestens eine Wirksubstanz enthalten. Die Oberfläche kann glatt oder rauh sein.

Die Mikropartikel können aus einer einzigen linearen Polysaccharidsubstanz, insbesondere 1,4- α -D-Polyglucan aufgebaut sein. Es ist aber auch möglich, ein anderes lineares wasserunlösliches Polysaccharid beizumischen. Auch können andere Polymere, insbesondere andere biokompatible Polymere mitverwendet werden. Dabei hängt die Menge des oder der anderen Polymeren, die beigemischt werden kann, ohne daß die sphärische Gestalt und sonstige gute Eigenschaften der Mikropartikel nachteilig verändert werden, stets von dem zugesetzten Polymer ab. Sie kann bei bis zu 10% und darüber liegen, in bestimmten Fällen auch darunter. Die noch vertretbare maximale Menge kann leicht durch wenige Mischversuche bestimmt werden.

Die Partikel können mittlere Durchmesser (Zahlenmittelwert) aufweisen wie 1 nm bis 100 μm , bevorzugt 100 nm bis 10 μm , besonders bevorzugt 1 μm bis 3 μm .

Die Partikel zeigen eine Charakteristik der Durchmesser d_w zu d_n von (Dispersität)

1,0 bis 10,0,

bevorzugt 1,5 bis 5,0,

5 besonders bevorzugt 2,0 bis 2,6

d_n = Zahlenmittelwert des Durchmessers

d_w = Gewichtsmittelwert des Durchmessers.

10 Die hier benutzten Mittelwerte definieren sich wie folgt:

$d_n = \sum n_i \times d_i / \sum n_i$ = Zahlenmittelwert

$d_w = \sum n_i \times d_i^2 / \sum n_i \times d_i$ = Gewichtsmittelwert

15 n_i = Anzahl der Partikel mit dem Durchmesser d_i ,

d_i = ein bestimmter Durchmesser,

i = fortlaufender Parameter.

20 Der Begriff "Gewicht" steht hier nicht für Masse, sondern für ein gewichtetes Mittel. Die größeren Durchmesser erhalten einen höheren Stellenwert; durch den Exponenten 2 werden Durchmesser größerer Partikel stärker gewichtet.

Die Dispersität der Verteilung der Durchmesser bei den Partikeln ist definiert als:

$$D = d_w / d_n.$$

25 Die Uneinheitlichkeit der Verteilung der Durchmesser ist definiert als:

$$U = d_w / d_n - 1 = D - 1.$$

30 Je näher der Wert für die Uneinheitlichkeit bei "0" liegt, desto einheitlicher sind die Partikel hinsichtlich der Verteilung ihrer Größe geformt.

Die Mikropartikel können besonders auch wegen ihrer einheitlichen Gestalt und Größe in verschiedenen Anwendungsbereichen, entweder als solche in reiner Form oder dadurch, daß Wirksubstanzen im weitesten Sinn eingeschlossen sind, vorteilhaft eingesetzt werden, so z. B.

- 35 – als Additive für die Kosmetik in Salben, Pudern, Cremes, Pasten etc.,
- als Träger für Wirksubstanzen in pharmazeutischen und anderen Anwendungen,
- als Glättungsmittel, z. B. zum Verschließen von Poren oder Glätten von Graten,
- als Lebensmittelzusatzstoff, z. B. als Füllkomponente oder zum Verbessern von rheologischen Eigenschaften,
- als Additiv zur Veredelung von z. B. Emulsionspolymerisaten,
- 40 – als Trennhilfen, z. B. in der Abtrennung von Verunreinigungen,
- als Verkapselungsmaterial,
- als Träger für magnetische Partikel,
- als Füllmittel für bioabbaubare Polymere oder technische Polymere zur Eigenschaftskontrolle,
- als Additiv zur Eigenschaftskontrolle, z. B. der Porosität, des Gewichts, der Farbe usw.,
- 45 – als Partikelstandard zur Eichung oder Bestimmung der Partikelgröße unbekannter Materialien.

Einzelne Wirksubstanzen oder Wirkstoffkombinationen können z. B. folgender Aufstellung entnommen werden:
Pharmazeutische Wirkstoffe, Medikamente, Arzneistoffe, Peptide, Proteine, Nucleinsäuren, Vakzine, Antikörper, Steroide, Oligonucleotide, Aromen, Duftstoffe, Dünger, agrartechnische Wirksubstanzen wie Pestizide, Herbizide, Insektizide, Fungizide, Chemikalien mit speziellen Eigenschaften wie Leuchtstoffe, Emulgatoren, Tenside, Pigmente, Oxidationsmittel, Reduktionsmittel, Fullerene, magnetische Komplexe, z. B. paramagnetische Verbindungen.

50 Somit ist ein weiterer Gegenstand der Erfindung die Verwendung der vorstehend beschriebenen Mikropartikel zur kontrollierten z. B. einer retardierten Abgabe von Wirkstoffen.

Bei dem Verfahren handelt es sich um eine sehr einfache Vorgehensweise. Die Parameter zur Herstellung der Partikel können in weiten Bereichen vorgegeben werden wie Verhältnis Lösungsmittel zu Fällungsmittel, Temperatur während des Ausfällprozesses, Konzentration der Lösung, Geschwindigkeit der Zugabe der Lösung zum Fällungsmittel.

Die Partikel zeichnen sich durch eine hohe Einheitlichkeit hinsichtlich ihrer Größe und der Verteilung ihrer Durchmesser aus.

60 Durch die Wasserunlöslichkeit des Ausgangspolymeren z. B. 1,4- α -D-Polyglucan lassen sich besonders vorteilhaft Anwendungen verwirklichen, die nicht auf eine schnelle Zerstörung der Mikropartikel aus sind und daher auch besonders vorteilhaft in Produkten verwendet werden können, in denen Wasser als eine weitere Komponente enthalten ist.

Die Mikropartikel zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, daß sie einer hohen mechanischen Belastbarkeit ausgesetzt werden können.

Insbesondere wirken die Partikel aufgrund ihrer Morphologie und Einheitlichkeit glättend, z. B. von Poren.

65 Das bevorzugt zum Einsatz gelangende 1,4- α -D-Polyglucan kann auf verschiedene Weisen hergestellt werden. Eine sehr vorteilhafte Methode wird in der WO 95/31 553 beschrieben. Auf die Offenbarung in dieser Schrift wird sich hier ausdrücklich bezogen.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1

Herstellung von Mikropartikeln aus 1,4- α -D-Polyglucan

500 mg 1,4- α -D-Polyglucan werden in 2,5 ml Dimethylsulfoxid (DMSO, p.a. von Riedel-de-Haen) bei ca. 70°C gelöst. Die DMSO-Lösung wird in 100 ml bidestilliertem Wasser unter Rühren eingetropft und die Lösung über Nacht bei 5°C aufbewahrt. Die feine milchige Suspension wird für 15 Minuten bei 3500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Der Bodensatz wird mit bidestilliertem Wasser aufgeschlämmt und erneut zentrifugiert. Der Vorgang wird noch zwei Mal wiederholt. Die Suspension wird im Anschluß gefriergetrocknet. Es werden 311 mg weißer 1,4- α -D-Polyglucan-Partikel erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 62% farbloser Mikropartikel.

Beispiel 2

Versuch zur Herstellung von Mikropartikeln aus Amylose, die aus Pflanzen separiert wurde

500 mg Amylose (aus Kartoffeln von EGA-Chemie) werden in 2,5 ml Dimethylsulfoxid (DMSO, p.a. von Riedel-de-Haen) bei ca. 70°C gelöst. Die DMSO-Lösung ist hochviskos. Sie wird unter Rühren in 100 ml bidestilliertem Wasser gegeben und die Lösung wird über Nacht bei 5°C aufbewahrt. Es bildet sich eine weiße flockige Suspension aus. Die weitere Aufarbeitung erfolgt wie in Beispiel 1 beschrieben. Es werden 210,3 mg eines weißen Feststoffs erhalten (42% Ausbeute), bei dem es sich um nicht-partikuläre Strukturen handelt.

Beispiel 3

Versuch zur Herstellung von Mikropartikeln aus Amylose, die aus Pflanzen separiert wurde

Dieser Versuch wird analog zu Beispiel 2 durchgeführt. Es werden 500 mg Amylose der Firma Merck (Herstellerangabe: "Amylose für biochemische Zwecke") eingesetzt. Nach der Standzeit über Nacht hat sich eine weiße flockige Suspension ausgebildet. Die weitere Aufarbeitung erfolgt wie in Beispiel 1 beschrieben. Es werden 60 mg eines weißen Feststoffs erhalten (12% Ausbeute), dessen Morphologie und Struktur sehr voluminös ist. Partikuläre Strukturen werden in diesem Vergleichsbeispiel analog zu Vergleichsbeispiel 2 nicht beobachtet.

Beispiel 4 bis 8

Versuche zur Herstellung von Mikropartikeln aus Stärke, die aus verschiedenen Pflanzen separiert wurde

500 mg Stärke (Spezifikation siehe Tabelle 1) werden in 2,5 ml Dimethylsulfoxid (DMSO, p.a. von Riedel-de-Haen) bei ca. 70°C gelöst. Es bilden sich keine Lösungen aus. Die Mischungen bilden zähe Gele aus. Diese werden unter Rühren zu 100 ml bidestilliertem Wasser gegeben. Dabei zerfällt das Gel. Die Lösung wird über Nacht bei 5°C aufbewahrt. Es bilden sich stark getrübe Suspensionen mit einer hohen Anzahl großer weißer Flocken aus. Die weitere Aufarbeitung erfolgt wie in Beispiel 1 beschrieben. Die Ergebnisse der Beispiele sind in Tabelle 1 aufgelistet. Bei allen Vergleichsbeispielen 2 bis 8 fällt auf, daß die nicht-linearen Polysaccharide oder sonstigen Ausgangsmaterialien von den Ergebnissen der in Beispiel 1 beschriebenen Erfindung sehr stark abweichen. Es bilden sich ausnahmslos starke Trübungen oder/und große Flocken aus.

Partikulär geformte Strukturen lassen sich nicht beobachten. Darüber hinaus sind die Ausbeuten an Feststoffen in den Vergleichsbeispielen 2 bis 8 deutlich geringer im Vergleich zu Beispiel 1.

Tabelle 1

Ergebnisse der Fällung von verschiedenen Stärke-DMSO-Lösungen in Wasser

Beispiel	Stärke Typ	Anteil lineares Polysaccharid (%)	Konsistenz der DMSO Lösung	Konsistenz der Suspension nach der Fällung bei 5 °C	Auswaage (mg)	Ausbeute (%)
1	1,4- α -D-Polyglucan* ¹	100	klare, niedrigviskose Lösung	feine, milchige Suspension	311,0	62
2	Amylose* ² (EGA-Chemie)	90 - 100	nach 2d gelöst, hochviskos	feine Suspension mit Flocken	210,3	42
3	Amylose* ² (Merck)	95 - 100	nach 2d gelöst, in der Wärme hochviskos	feine Suspension mit Flocken	60,0	12
4	Kartoffel Toffena TM (Südstärke)	20	festes Gel, klar	starke Trübung	nicht abtrennbar (Zentrifuge)	---
5	Mais Stärke (Merck)	20	zähes Gel	leichte Trübung, große Flocken	83,8	17
6	Mais Stärke C (National Starch)	50	zähes Gel	starke Trübung, kleine Flocken	101,7	20
7	Mais Stärke HVII (National Starch)	70	zähes Gel	starke Trübung, kleine Flocken	211,1	42
8	Erbsen (Amylose KG)	70	zähes Gel, trüb	starke Trübung, große Flocken	115,9	23

*¹ wasserunlöslich*² wasserlöslich

Beispiel 9a und 9b

Herstellung von Mikropartikeln aus 1,4- α -D-Polyglucan im großen Maßstab

a) 400 g 1,4- α -D-Polyglucan werden in 2 l Dimethylsulfoxid (DMSO, p.a. von Riedel-de-Haen) bei 60°C innerhalb von 1,5 h gelöst. Dann wird eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird in 20 l bidestilliertem Wasser unter Rühren durch einen Tropftrichter über einen Zeitraum von 2 h hinzugegeben. Der Ansatz wird für 44 h bei 4°C gelagert. Es bildet sich eine feine Suspension aus. Die Partikel werden abgetrennt, indem zunächst der Überstand abdekantiert wird. Der Bodensatz wird aufgeschlämmt und in kleinen Portionen zentrifugiert (Ultrazentrifuge RCSC: je 5 Minuten bei 5000 Umdrehungen pro Minute). Der feste Rückstand wird insgesamt drei Mal mit bidestilliertem Wasser aufgeschlämmt und erneut zentrifugiert. Die Feststoffe werden gesammelt und die Suspension von ca. 1000 ml gefriergetrocknet (Christ Delta 1-24 KD). Es werden 283 g weißer Feststoff isoliert (Ausbeute 71%).

b) Die gesammelten Überstände werden bei einer Temperatur von -18°C über Nacht verwahrt. Die Aufarbeitung erfolgt wie beschrieben. Es werden weitere 55 g des weißen Feststoffs isoliert (Ausbeute 15%).

Die Gesamtausbeute dieses Prozesses beträgt somit 85% an farblosen Mikropartikeln.

Beispiel 10

Entschwefelung der Mikropartikel

Zur Abtrennung in den Partikeln verbliebenen Dimethylsulfoxids wird wie folgt vorgegangen. 100 g der 1,4- α -D-Polyglucan aus Beispiel 9 werden in 1000 ml entionisiertem Wasser gegeben. Der Ansatz wird für 24 h unter leichtem Schwenken sich selbst überlassen. Die Abtrennung der Partikel erfolgt wie in Beispiel 9 beschrieben (Ultrazentrifuge RCSC: je 15 Minuten, 3000 U/min. Nach der Gefriertrocknung ergibt sich eine Auswaage von 98.3 g (98% Ausbeute). Die Schwefelbestimmung durch Elementaranalyse ergibt folgende Werte (Prüfmethode Verbrennung und IR-Detektion):

Schwefelgehalt der Partikel aus Beispiel 9 : $6\% \pm 0,1\%$;

Schwefelgehalt der Partikel aus Beispiel 10: $<0,01\%$.

Beispiel 11

Untersuchungen der Feststoffe aus den Beispielen 1 bis 9 mittels Elektronenmikroskopie

Zur Charakterisierung der Partikel werden Rasterelektronenmikroskopaufnahmen (REM) (Camsan S-4) durchgeführt. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 2 festgehalten. Dabei wird deutlich, daß nur bei der Verwendung wasserunlöslicher linearer Polysaccharide (1,4- α -D-Polyglucan) sphärisch runde Mikropartikel erhalten werden. Dagegen führt die Verwendung anderer Ausgangspolymere nur zu voluminösen, watteartigen und nicht-partikulären Morphologien, von denen eine Dispersität nicht bestimmbar ist. Die Struktur der gemäß Beispiel 1 erhaltenen Partikel ist aus Abb. 1 und 2 ersichtlich.

Tabelle 2

Charakterisierung der Feststoffe und Partikel aus den Beispielen 1 bis 3 und 7 bis 9

Beispiel	Stärke Typ	Anteil lineares Polysaccharid (%)	Aussehen der Partikel
1	1,4- α -D-Polyglucan* ¹	100	runde separierte Partikel
2	Amylose* ² (EGA-Chemie)	90 - 100	flockig, voluminös, watteartig (d.h. keine separierten Partikel)
3	Amylose* ² (Merck)	95 - 100	flockig, voluminös, watteartig (d.h. keine separierten Partikel)
7	Mais Hylon VII (National Starch Chemistry)	70	flockig, watteartig (d.h. keine separierten Partikel)
8	Erbsen (Amylose KG)	70	flockig, watteartig (d.h. keine separierten Partikel)
9a	1,4- α -D-Polyglucan	100	runde separierte Partikel
9b	1,4- α -D-Polyglucan	100	runde separierte Partikel

*¹ wasserunlöslich*² wasserlöslich

Beispiel 12

Untersuchungen der Größenverteilungen der Partikel aus den Beispielen 1 und 9

Zur Charakterisierung der Größenverteilungen der Partikel aus den Beispielen 1 und 9 werden Untersuchungen mit einem Mastersizer durchgeführt (Fa. Malvern Instruments). Die Untersuchung erfolgte im Fraunhofer-Modus (Auswertung: multimodal, Anzahl) mit einer Dichte von 1.080 g/cm³ und Volumenkonzentration im Bereich von 0,012% bis 0,014%. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 3 aufgelistet und zeigen die hohe Einheitlichkeit der Mikropartikel.

Beispiel 13

In-vitro-Produktion von 1,4- α -D-Polyglucan in einem biokatalytischen Prozeß mit Hilfe von Amylosucrase

In einem sterilisierten (Dampfsterilisation) 15 l Gefäß werden 10 l einer 20%igen Saccharose-Lösung gegeben. Der Enzymextrakt, Amylosucrase enthaltend, wird in einer Portion zugegeben. Die Enzymaktivität beträgt in diesem Experiment 16 units. Die Apparatur wird mit einem ebenfalls sterilisierten KPG-Rührer versehen. Das Gefäß wird verschlossen und bei 37°C aufbewahrt und gerührt. Bereits nach einer Zeit von wenigen Stunden bildet sich ein weißer Niederschlag. Die Reaktion wird nach einer Zeitdauer von 180 Stunden beendet. Der Niederschlag wird abfiltriert und zur Abtrennung niedermolekularer Zucker fünf Mal mit Wasser gewaschen. Der im Filter verbleibende Rückstand wird bei 40°C im Trockenschrank unter Anlegung eines Vakuums mit Hilfe einer Membranpumpe (Firma Vacuubrand GmbH & Co, CVC 2) getrocknet. Die Masse beträgt 685 g (Ausbeute 69%). Das so erhaltene 1,4- α -D-Polyglucan kann direkt für die Charakterisierung und für die Herstellung von Mikropartikeln eingesetzt werden.

Beispiel 14

Charakterisierung des mit Amylosucrase synthetisierten wasserunlöslichen 1,4- α -D-Polyglucans aus Beispiel 13

Es werden 2 mg des 1,4- α -D-Polyglucans aus Beispiel 13 bei Raumtemperatur in Dimethylsulfoxid (DMSO, p.a. von Riedel-de-Haen) gelöst und filtriert (2 μ m Filter). Ein Teil der Lösung wird in eine Gelpermeationschromatographie-Säule injiziert. Als Elutionsmittel wird DMSO verwendet. Die Signalintensität wird mittels eines RI-Detektors gemessen und gegen Pullulanstandards (Firma Polymer Standard Systems) ausgewertet. Die Flußrate beträgt 1.0 ml pro Minute.

Die Messung ergibt ein Zahlenmittel des Molekulargewichts (M_n) von 14.200 g/mol und ein Gewichtsmittel des Molekulargewichts (M_w) von 29.500 g/mol. Dies entspricht einer Dispersität von 2,1.

Tabelle 3

Charakterisierung der Partikeldurchmesser aus den Beispielen 1 und 9

Beispiel	Durchmesser			Partikelverteilung		
Beispiel No.	d_n^{*1} (μ m)	d_w^{*2} (μ m)	d_w / d_n^{*3}	$d(10\%)^{*4}$ (μ m)	$d(50\%)^{*5}$ (μ m)	$d(90\%)^{*6}$ (μ m)
1	1,282	2,692	2,100	0,991	1,263	1,776
9a	1,664	4,184	2,541	0,873	1,504	2,624
9b	0,945	2,345	2,481	0,587	0,871	1,399

*¹ d_n : Zahlenmittelwert des Durchmessers

*² d_w : Gewichtsmittelwert des Durchmessers

*³ d_w / d_n : Dispersität der Partikeldurchmesser

*⁴ $d(10\%)$: 10 % aller Partikel haben einen kleineren Durchmesser als der angegebene Wert

*⁵ $d(50\%)$: 50 % aller Partikel haben einen kleineren Durchmesser als der angegebene Wert

*⁶ $d(90\%)$: 90 % aller Partikel haben einen kleineren Durchmesser als der angegebene Wert

1. Sphärische Mikropartikel mit einem mittleren Durchmesser von 1 nm bis 100 µm, bestehend ganz oder teilweise aus mindestens einem wasserunlöslichen linearen Polysaccharid.
- 5 2. Sphärische Mikropartikel mit einem mittleren Durchmesser von 1 nm bis 100 µm, bestehend ganz oder teilweise aus mindestens einem wasserunlöslichen linearen Polysaccharid, welches in einem biotechnischen Prozeß hergestellt wurde.
3. Sphärische Mikropartikel mit einem mittleren Durchmesser von 1 nm bis 100 µm nach Anspruch 2, bestehend ganz oder teilweise aus mindestens einem wasserunlöslichen linearen Polysaccharid, welches durch einen biokatalytischen Prozeß hergestellt wurde.
- 10 4. Sphärische Mikropartikel mit einem mittleren Durchmesser von 1 nm bis 100 µm nach Anspruch 2, bestehend ganz oder teilweise aus mindestens einem wasserunlöslichen linearen Polysaccharid, welches durch einen fermentativen Prozeß hergestellt wurde.
5. Sphärische Mikropartikel nach Anspruch 1, bestehend ganz oder teilweise aus 1,4- α -D-Polyglucan.
- 15 6. Mikropartikel nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß 1,4- α -D-Polyglucan mittels eines biokatalytischen Prozesses mit Hilfe von Polysaccharidsynthasen hergestellt wurde.
7. Mikropartikel nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß 1,4- α -D-Polyglucan mittels eines biokatalytischen Prozesses mit Hilfe von Stärkesynthasen hergestellt wurde.
8. Mikropartikel nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß 1,4- α -D-Polyglucan mittels eines biokatalytischen Prozesses mit Hilfe von Glykosyltransferasen hergestellt wurde.
- 20 9. Mikropartikel nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß 1,4- α -D-Polyglucan mittels eines biokatalytischen Prozesses mit Hilfe von α -1,4-Glucantransferasen hergestellt wurden.
10. Mikropartikel nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß 1,4- α -D-Polyglucan mittels eines biokatalytischen Prozesses mit Hilfe von Glycogensynthasen hergestellt wurde.
- 25 11. Mikropartikel nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß 1,4- α -D-Polyglucan mittels eines biokatalytischen Prozesses mit Hilfe von Amylosucrasen hergestellt wurde.
12. Mikropartikel nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß 1,4- α -D-Polyglucan mittels eines biokatalytischen Prozesses mit Hilfe von Phosphorylasen hergestellt wurde.
13. Mikropartikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die linearen Polysacchariden durch enzymatische Behandlung von verzweigten oder hochverzweigten Polysacchariden hergestellt wurden.
- 30 14. Mikropartikel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 13 mit einem mittleren Durchmesser von 100 nm bis 10 µm, vorzugsweise 1 bis 3 µm.
15. Mikropartikel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 14, gekennzeichnet durch eine enge Verteilung der Partikeldurchmesser (Dispersität).
- 35 16. Mikropartikel nach Anspruch 15, gekennzeichnet durch eine Dispersität der Partikeldurchmesser d_w zu d_n von 1,0 bis 10,0 vorzugsweise von 1,5 bis 5,0, insbesondere 2,0 bis 2,6.
17. Mikropartikel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß sie zusätzlich ein oder mehrere, vorzugsweise biologisch abbaubare Polymere enthalten.
18. Mikropartikel nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß sie zusätzlich einen oder mehrere Wirkstoffe enthalten.
- 40 19. Verfahren zur Herstellung von sphärischen Mikropartikel, welche ganz oder teilweise aus wasserunlöslichen linearen Polysacchariden, insbesondere 1,4- α -D-Polyglucan bestehen durch Lösen des wasserunlöslichen linearen Polysaccharids oder des 1,4- α -D-Polyglucans in einem Lösungsmittel, Einbringen der Lösung in ein Fällmittel, Kühlen des dabei entstehenden Gemisches und Abtrennen der gebildeten Mikropartikel.
- 45 20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß man Lösung und Fällmittel bei Temperaturen von 20 bis 50°C vermischt und das Gemisch auf Temperaturen von +10 bis -10°C, vorzugsweise 5 bis -5°C kühlt.
21. Verfahren nach Anspruch 19 oder 20, dadurch gekennzeichnet, daß man als Lösungsmittel Dimethylsulfoxid verwendet.
22. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 19 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß man als Fällmittel Wasser oder ein wäßriges Medium verwendet.
- 50 23. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 19 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß man die Lösung in Gegenwart eines oder mehrerer Polymere, insbesondere biologisch abbaubare Polymere und/oder eines oder mehrerer Wirkstoffe herstellt.
24. Verwendung der Mikropartikel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 18 oder der nach einem Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 19 bis 23 hergestellten Mikropartikel zur kontrollierten Abgabe von Wirkstoffen.
- 55 25. Verwendung der Mikropartikel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 18 oder der nach einem Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 19 bis 23 hergestellten Mikropartikel als Standard zur Größenbestimmung von Partikeln.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Abbildung 1

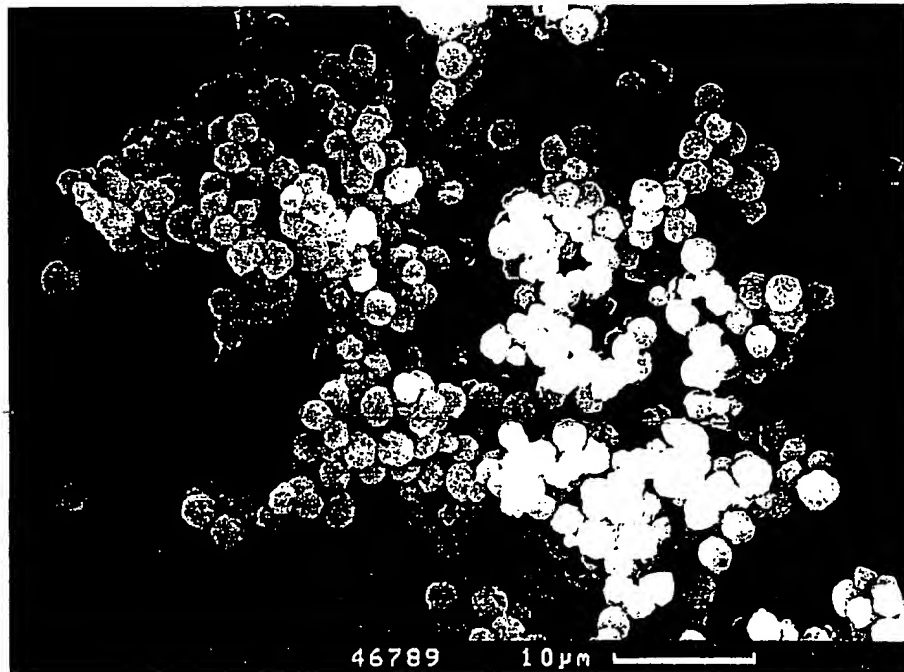


Abbildung 2

